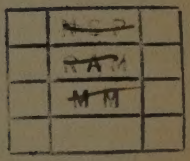
UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

428

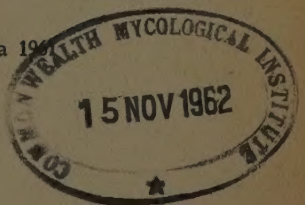
E. AQUARONE - G. PICCI

ALCUNE RICERCHE SULLA BIOSINTESI DELLA RIBOFLAVINA DA PARTE DELLA MICROFLORA DEL TERRENO

Estratto da « *L'Agricoltura Italiana* » - N. 8 - Agosto 1961.



Tipografia Editrice Comm. U. GIARDINI - Pisa 19



UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

428

E. AQUARONE - G. PICCI

ALCUNE RICERCHE SULLA BIOSINTESI DELLA RIBOFLAVINA DA PARTE DELLA MICROFLORA DEL TERRENO

Estratto da « *L'Agricoltura Italiana* » - N. 8 - Agosto 1961.

Tipografia Editrice Comm. U. GIARDINI - Pisa 1961

RIASSUNTO. — E' stato dosato in alcuni campioni di terreno, prelevati a varie profondità e diversi per costituzione e stato colturale, il loro contenuto in riboflavina. Da alcuni di questi terreni sono state isolate specie microbiche al fine di saggiare la loro attività flavinogenetica. Tale attività è apparsa modesta, almeno in relazione a quella svolta dalle più note specie di utilizzazione industriale.

L'azione dei raggi UV si è infine manifestata deprimente tale attività.

SUMMARY. — Some samples of soil, kept at various depths and differing by structure and cultural state, were examined in their riboflavin content. From some of these semples microbial species were isolated and tested in their flavinogenic activity.

Such activity resulted low, at least against that shown by the most important industrially utilized species.

Finally, the action of U.V. rays was shown decreasing such activity.

E' ormai noto che tutte o quasi le vitamine del complesso B, unitamente ad altri fattori di crescita, sono reperibili nel suolo ([1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]).

La genesi di tali sostanze è stata messa in rapporto a varie sorgenti quali i residui vegetali, i fertilizzanti organici, l'apparato radicale delle piante, i microrganismi. Naturalmente ciascuno di questi fattori influisce quando più quando meno; tuttavia, per quanto si riferisce ai microrganismi, l'apporto vitaminico da loro offerto risulta tutt'altro che trascurabile.

Certo, al pari di altre sostanze di origine microbica, anche le vitamine sono soggette, nel suolo, allo stesso equilibrio dinamico quale risulta dallo svolgersi dei processi vitali che nello stesso suolo hanno sede. In altre parole, la concentrazione vitaminica nel terreno dipende dal bilancio che si stabilisce tra i processi costruttivi e quelli distruttivi.

A quanto ci risulta si hanno ben poche osservazioni sulla presenza di riboflavina nel terreno e sui relativi germi terricoli produttori.

Ricorderemo così due lavori di STARKEY e SCHMIDT ([8, 9]) i quali dosarono le quantità di acido nicotinico, pantotenico e riboflavina

che si ottenevano nel tempo durante la decomposizione della sostanza organica incorporata nel terreno.

E' citato ancora un primo lavoro di BALICKA e Coll. ([10]) che trovarono una ben definita correlazione tra il numero totale dei microrganismi nel terreno e il contenuto in sostanza organica, saccarasi e riboflavina. In un secondo lavoro gli stessi Aa. ([11]) determinarono in vari terreni diversamente coltivati le relazioni esistenti tra saccarasi, ureasi, proteasi, numero totale dei microrganismi e tenore in riboflavina. Osservarono, anche in questa seconda serie di ricerche, l'esistenza di una correlazione tra il numero dei germi, la sostanza organica e il contenuto in B_2. GUNDERSEN ([12]) osservò invece che la nitrificazione da parte di *Nitrosomonas* sp. non risultava influenzata da tiamina, biotina, ac. p-aminobenzoico, nicotinamide, piridossina, ac. pantotenico e vit. B_2, sole o combinate.

KISS ([13]), finalmente, constatò che la riboflavina non altera l'attività della saccarasi in campioni di terreno essiccati all'aria od inumiditi, mentre l'attività dell'enzima risulta aumentata in terreni addizionati di saccarosio.

In estensione a queste ricerche ci è parso degno di un certo interesse prendere in esame un determinato numero di campioni di suolo di varia natura e provenienza e determinare in essi e a diverse profondità il contenuto in riboflavina. Per i campioni che avessero offerto un dato positivo pensammo poi di eseguire il saggio riboflavinogenico per un certo numero di microrganismi presenti. Finalmente, rinvenendosi ceppi produttori di B_2, si è pensato interessante sottoporli a trattamento con raggi u. v. al fine di osservare il comportamento, dal punto di vista della flavinogenesi, delle eventuali insorgenti mutanti.

Materiali e metodi

Natura e provenienza dei campioni di suolo.

Sono stati presi in esame i seguenti terreni:

I. T. di campo di medio impasto, coltivato a patata
II. T. di letto caldo di vegetazione, non coltivato

III. T. di campo, molto argilloso, coltivato a mais
IV. T. come sopra coltivato a trifoglio
V. T. di collina, sassoso, coltivato ad ulivo e concimato con letame di pecora
VI. T. come sopra, non concimato
VII. T. di campo di medio impasto, letamato e coltivato a zucca
VIII. T. sabbioso, di foce di fiume con vegetazione spontanea

Tali campioni provenivano tutti dai terreni sperimentali della Facoltà di Agraria ad eccezione di quello della foce di fiume (Arno) e quello di uliveto (Agnano nei Monti Pisani). Il prelevamento, quando era possibile, veniva effettuato a quattro diverse profondità: cm 0; 12-15; 25-30; 40.

Estrazione della riboflavina dal suolo.

100 g di terreno venivano posti in Soxhlet con 200 ml di acetone cloridrico (3 p. di acetone e 1 di HCl/N) per nove ore ([14]). (*) L'efficacia di tale metodo venne accertata dosando in campioni test di terreno la riboflavina aggiunta in quantità nota. In questi campioni test la vit. B_2 eventualmente presente veniva distrutta mediante esposizione prolungata ai raggi u. v. (otto ore).

Una volta ottenuto l'estratto questo veniva posto in capsula, essiccato quasi completamente in b. m. bollente, quindi ripreso con acqua distillata e portato a 100 ml con correzione del pH a 6-6.2. Su tale estratto veniva quindi effettuato il dosaggio vitaminico.

Dosaggio.

Con metodo microbiologico a mezzo di *Lactobacillus casei 74 69 ATCC* e dosaggio per via acidimetrica ([15]). La quantità di riboflavina trovata è stata espressa in µg per Kg di terra (peso secco). Cinque replicazioni per prova.

(*) In parallelo veniva dosata nel campione di terreno l'umidità per poter poi riferire il dato al terreno secco.

Isolamenti microbici.

I campioni di terreno che avevano dato reperto positivo, anche se relativamente debole, furono sottoposti ad analisi batteriologica al fine di isolare un certo numero di Schizomiceti, Attinomiceti e Funghi. Come substrato di coltura fu impiegato agar-fagioli saccarosato per gli Schizomiceti, agar-peptone-estratto di carne con NaCl per gli Attinomiceti e agar-malto per i Funghi. Gli isolati venivano successivamente trapiantati in mezzi nutritivi privi di riboflavina e soltanto i ceppi capaci di moltiplicarsi in tali substrati erano conservati per ulteriori prove.

I terreni alimentari selettivi erano i seguenti: per gli Schizomiceti, « Bacto Riboflavin Assay Medium (B, 325) » della DIFCO distribuito in matraccini da 50 ml in ragione di 20 ml ciascuno; per gli Attinomiceti il liquido di WAKSMAN (*) distribuito in fiasche di Roux, 200 ml cadauna; per i Funghi il liquido di Czapek-Dox in beute da 100 ml in ragione di 25 ml ciascuna.

Colture statiche a 26°C.

Dopo un periodo opportuno di incubazione pari a 72 ore per i batteri, 8 giorni per i funghi e 10 giorni per gli attinomiceti, dai recipienti dove si aveva sviluppo apprezzabile venivano prelevati 5 ml di liquido colturale e ivi dosata — previo allontanamento della massa microbica — la riboflavina presente. Il risultato era rapportato a ug/litro di mezzo colturale. Prove in triplo.

Irradiazione.

Sospensioni microbiche in soluzione fisiologica venivano poste, in strati di due-tre millimetri, in piastre Petri ed esposte quindi, a tempi crescenti, a 45 cm dalla sorgente dell'U.V. costituita da una lampada HANAU Mod. S-300.

I tempi di esposizione all'irradiazione sono stati per gli schizomiceti 1'-2'-3'-4'-6'-10'; per gli eumiceti 5'-10'-15'.

(*) $NaNO_3$ 2, $K_2HPO_4.7H_20$ 0.5, KCl 0.5, $FeSO_4$ 0.01, saccarosio 30, acqua fino a 1000 ml.

TAB. I

N° progressivo del campione	Campione del terreno	Profondità cm.	µg di B_2 per Kg di terreno (peso secco) (*)
1	I - Terreno di campo, medio impasto, coltivato a patata	0	0
2		15	0
3		30	0.75
4		40	0.75
5	II - Terreno di letto caldo	0	0
6		10	0
7		20	12
8	III - T. di campo, argilloso, coltivato a mais	0	0
9		10	0
10	IV - Id. c. s., coltivato a trifoglio	0	0.88
11		10	1.20
12	V - Terreno olivato, sassoso, concimato	0	2.50
13		15	2.10
14		30	2.75
15		40	2.68
16	VI - Id. c. s., non concimato	0	4.18
17		15	1.18
18		30	3.50
19		40	1.90
20	VII - T. di campo medio impasto, letamato	0	0
21		10	0
22		30	2.40
23		40	5.00
24	VIII - T. sabbioso di fore di fiume	0	0
25		15	0
26		30	0
27		40	0

(*) Media di cinque replicazioni.

Risultati

Tenore in riboflavina nei terreni esaminati.

Il dosaggio microbiologico della riboflavina nei terreni esaminati ha dato i risultati cui alla annessa Tabella I.

Sebbene il tenore di riboflavina trovato sia in molti casi molto basso, soltanto due tipi di terreno hanno dato un risultato completamente negativo: il terreno molto argilloso coltivato a mais e quello tipicamente sabbioso.

Produzione di riboflavina da parte dei ceppi isolati.

I microgranismi che hanno dimostrato la capacità di crescere in mezzi privi di riboflavina sono stati saggiati come produttori di vitamina ottenendosi i risultati cui alla Tabella II.

Tab. II

		µg di B_2 per litro di liq. colt. (°)			µg di B_2 per litro di liq. colt. (°)
Schizomiceti	15-34(°°)	19.0	Eumiceti	15-28(°°)	16.0
	16-1	3.6		15-30	1.2
	16-2	18.5		15-38	720.0
	16-3	54.0		15-39	750.0
	16-4	40.5		16-19	7.0
	16-5	37.0		16-21	0
	16-7	1.7		16-37	0
	16-8	26.8		18-16	14.2
	16-9	1.6		18-17	0.5
	16-10	1.6		18-18	13.6
	16-11	41.1		7-40	30
	16-12	56.5		7-41	30
	16-13	1.2		7-42	12.1
	16-14	19.5		7-43	2.5
				7-44	16.5
				7-45	24.4
				7-46	24.4
				23-51	26.3
				23-52	143.5
Attinomiceti	15-24(°°)	0		23-53	20.5
	15-26	0		23-54	25.0
	15-32	0		23-55	153.6

(°) Dopo 72 ore di incubazione per gli schizomiceti; 8 giorni per i funghi e 10 giorni per gli attinomiceti.

(°°) Il primo numero della etichettatura dei singoli ceppi si riferisce al n. del campione di prelevamento (cfr. Tab. I); il secondo è quello progressivo dell'isolamento.

Trentaquattro dei 39 ceppi isolati e saggiati (cioè l'87% circa) si sono dimostrati capaci di produrre riboflavina.

Tra gli schizomiceti e gli attinomiceti non abbiamo peraltro trovato ceppi particolarmente flavinogenetici. Valori ugualmente modesti si sono trovati per i funghi. Tra questi degni di nota i ceppi 15-39, 15-38, 23-55 e 23-52. Il primo risultò essere *Pen. chrisogenum*, il secondo risultò appartenere al gruppo di *Pen. janthinellum*.

Effetti dell'irradiazione con U.V. sopra la produzione di B_2 da parte di alcuni ceppi.

Sono stati trattati quattro ceppi di schizomiceti e quattro di funghi ottenendosi i risultati seguenti:

Tab. III

		Quantità di riboflavina in γ/l di liq. colturale							
		nei ceppi originali	dopo irradiazione per						
			1'	2'	4'	5	6'	10'	15'
Schizomiceti:	16.3	54.0	7.5	7	6.6	—	6.4	—	—
	16-4	40.0	—	1.8	4.3	—	—	—	—
	16-5	37.0	5.4	4.8	—	—	—	—	—
	16-12	56.5	7.4	6.6	6	—	4.9	4.2	—
Eumiceti:	15-28	16.0	—	—	—	30.0	—	25.0	—
	15-38	720.0	—	—	—	14.0	—	16.8	9.8
	15-39	750.0	—	—	—	12.3	—	12.0	12.0
	16-19	7.0	—	—	—	0	—	0	0

L'irradiazione all'U.V. ha quindi provocato (ad eccezione del ceppo 15-28) la caduta o addirittura la scomparsa dell'attività riboflavinogenetica.

Discussione

Nel valutare le diverse quantità di riboflavina reperite nei terreni esaminati occorre tenere presente, come da prima accennato, che

la vitamina B_2 rinvenibile in un determinato momento, altro non rappresenta — analogamente a molte altre sostanze — che il risultato dell'equilibrio esistente in quel momento tra i processi di biosintesi e quelli demolitivi. Secondo SCHMIDT e STARKEY [9] i processi costruttivi — a proposito della riboflavina e dell'acido pantotenico — dominerebbero sopra quelli distruttivi, ad es., durante i primi stadi di decomposizione della sostanza organica, quando cioè sono preferenzialmente attaccati i composti di più facile demolizione.

La mancata presenza in due dei campioni esaminati (camp. III e VIII) verosimilmente è da mettersi in rapporto con la loro riscontrata bassa carica microbica. Infatti se, per mutate condizioni colturali, si stabilisce nello stesso terreno un più elevato livello microbico — come abbiamo notato nel camp. IV coltivato a trifoglio rispetto al camp. III coltivato a mais — allora nello stesso terreno si rinviene un certo contenuto in riboflavina.

Per ciò che concerne la capacità riboflavino-genica dei ceppi isolati osserviamo che gli schizomiceti hanno dato tutti valori modesti e comunque lontani da quelli che danno le specie utilizzate industrialmente. E' vero che queste ultime appartengono a gruppi sistematicamente diversi da quelli da noi isolati trattandosi di Clostridi anaerobi. In più, i ceppi da noi isolati, sono stati saggiati in un unico mezzo mentre quelli di uso industriale sono stati saggiati su di una gamma molto estesa di mezzi alimentari sia naturali che sintetici [16].

Così dicasi per i funghi nonostante due ceppi — risultati appartenere a *Pen. chrisogenum* e *Pen. janthinellum* — abbiamo dato valori assai maggiori di quelli medi dati dagli altri ceppi studiati. Non è da escludersi che, sotto l'influenza di particolari fattori che meriterà studiare, il rendimento di questi non sia suscettibile di aumento.

Il trattamento di alcuni ceppi con raggi UV non ha portato, infine, modificazioni positive nella loro attività flavinogenetica; all'opposto tale attività è stata, per lo stesso trattamento, depressa o addirittura soppressa.

E. AQUARONE - G. PICCI

Istituto di Microbiologia Agraria
dell' Università di Pisa

BIBLIOGRAFIA

(1) Audus L. J. - *Plant growth substances.* L. Hill, London 1953.

(2) Lochhead A. G. e Burton M. O. - *The incidence in soil bacteria requiring vitamin* B_{12} *and the terregens factor.* Soil Sc. *82*, 237, 1956.

(3) Roulet M. A. - *Reserches sur les vitamines du sol.* Experientia, *4*, 149, 1948.

(4) Roulet M. A. e Schopfer W. H. - *Les vitamines du sol et leur signification.* Trans. Int. Congr. Soil Sc., Amsterdam, *1*, 202, 1950.

(5) Schmidt E. L. - *Soil microorganisms and plant growth substances.* Soil Sc., *71*, 129, 19551

(6) Schopfer W. H. - *Plant and vitamins.* Chronica Botanica Co., Waltham, Mass 1943.

(7) Lochhead A. G. - *Soil bacteria and growth-promoting substances.* Bacteriol. Rev. *22* 145, 1958.

(8) Starkey R. L. - *Changes in the content of certain B-vitamins in organic materials decomposing under aerobic and anaerobic conditions.* Soil Sc., 57, 247, 1944.

(9) Schmidt E. L. e Starkey R. L. - *Soil microrganisms and plant growth substances: II.* Soil Sc., *71*, 221, 1951.

(10) Balicka N. e altri. - *Zawartosc witaminy* B_2 *w glebie jako wskaznik jej aktywnosci.* Roczn. Nauk., *70A*, 221, 1951.

(11) Balicka N. e altri. - *Aktywnosc enzymatyczna i obenosc witaminy* B_2 *w glebie.* Acta microb. polon., 5, 377, 1956.

(12) Gundersen K. - *Effects of B-vitamins and aminoacids on nitrification.* Physiol. Plant., *8*, 136, 1955.

(13) Kiss G. - *Untersuchungen ueber die Produktion von Saccharase im Boden.* Z. Pfl. Ernähr. Düng., *81*, 117, 1958.

(14) Ayerra B. L. - *Production of riboflavin by fermentation and its microbiological assay.* Rev. Fac. Cienc. Quim. La Plata, *28*, 95, 1953-54.

(15) *Difco Manual of dehydrated culture.* Detroit, 1953.

(16) Aquarone E. - *Produzione microbiologica di riboflavina.* L'Agr. Ital., *4*, 114, 1961.